PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

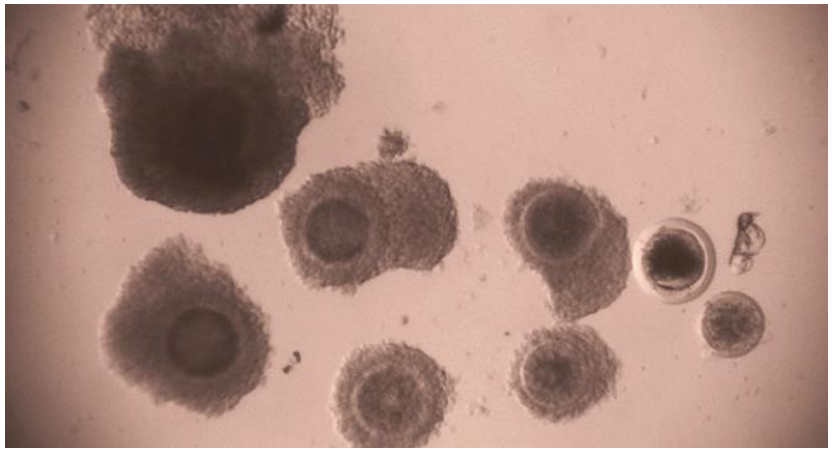
M.V. MAYARA DE VASCONCELOS

INTRODUÇÃO

- Envolve etapas de Coleta, Manipulação (MIV), Fertilização (FIV) e Cultivo (CIV).
- Utilizada para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir o descarte de animais portadores de alterações adquiridas que impeçam que a reprodução ocorra de forma natural.
- Embriões produzidos in vitro são aqueles produzidos pela manipulação de gametas fora do organismo
materno.
- O Brasil é referência mundial na aplicação desta biotécnica.

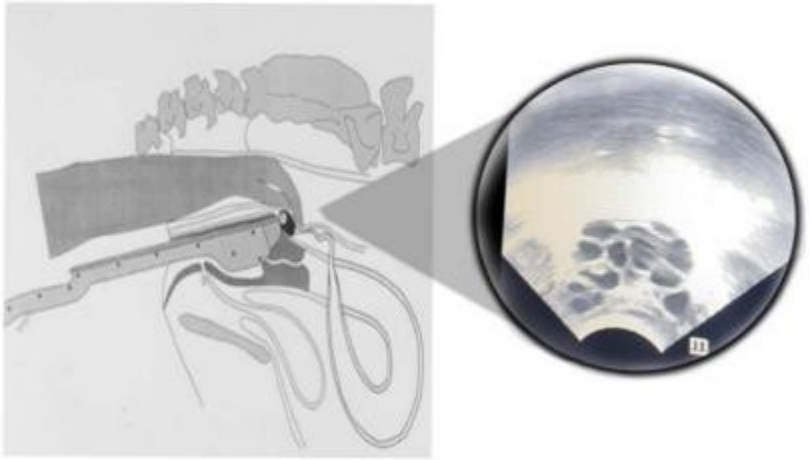
ETAPAS

- ***Coleta de oócitos***
- Obtidos in vitro a partir da punção folicular ou dissecção folicular de ovários de abatedouro OU in
  vivo por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (Ovum pick up).
- Após a recuperação dos oócitos, faz-se a seleção, levando em consideração o número de camadas de células do cumulus e o aspecto do citoplasma do oócito



OVUM PICK UP (OPU)

- Antes era realizada por laparotomia
- OPU: Possibilita obtenção de oócitos de fêmeas a partir dos seis meses de idade, idosas, pré púberes, prenhes até o terceiro mês ou ainda, durante o pós-parto entre a segunda e terceira semana.
- Esta técnica pode ser realizada a cada 15 dias ou mensalmente
- Punção folicular guiada por ultrassom
- Diâmetro dos folículos deve estar entre 2-8 mm, folículos menores que 2 mm são incapazes de recomeçar a fase de meiose e os maiores que 8 mm são desprezados, pois normalmente se encontram em estágio de atresia

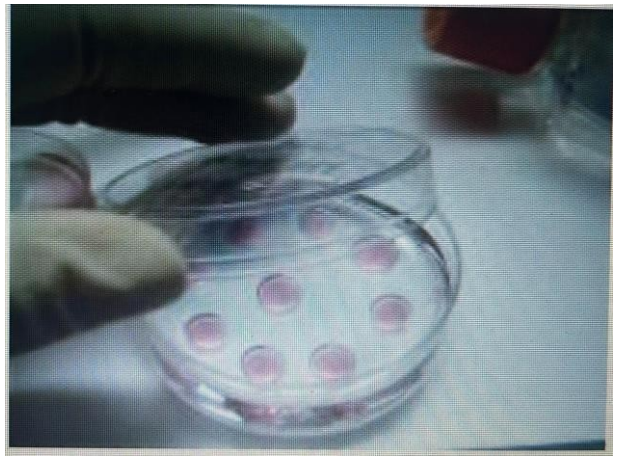


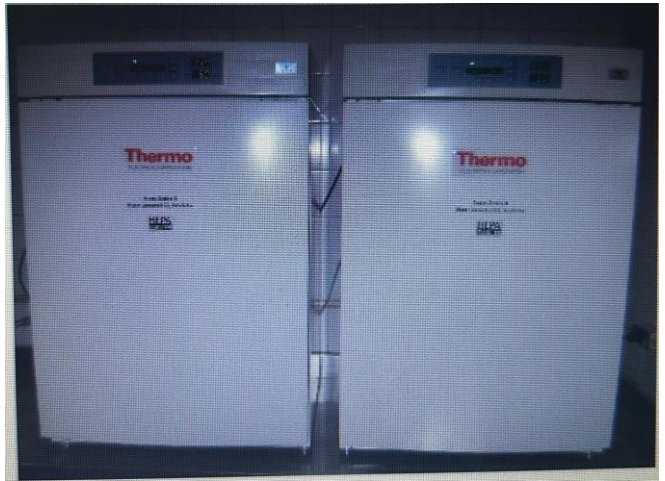
OVÁRIOS DE ABATEDOURO

- Coletados imediatamente após o abate e evisceração dos animais e armazenados para transporte em solução salina a 0,9% e temperatura entre 35 a 37°C.

ETAPAS

- ***Maturação in vitro de oócitos***
- Após coleta, oócitos necessitam de maturação
- A maturação é realizada cultivando os oócitos, logo após a aspiração do folículo, em meio de maturação, com temperatura e atmosfera apropriada, por um período de 22 a 24 horas
- Atmosfera de 5% de CO2 em ar, com uma temperatura de 39ºC. Após esse período os oócitos que maturaram são identificados visualmente pela expansão das células do cumulus.



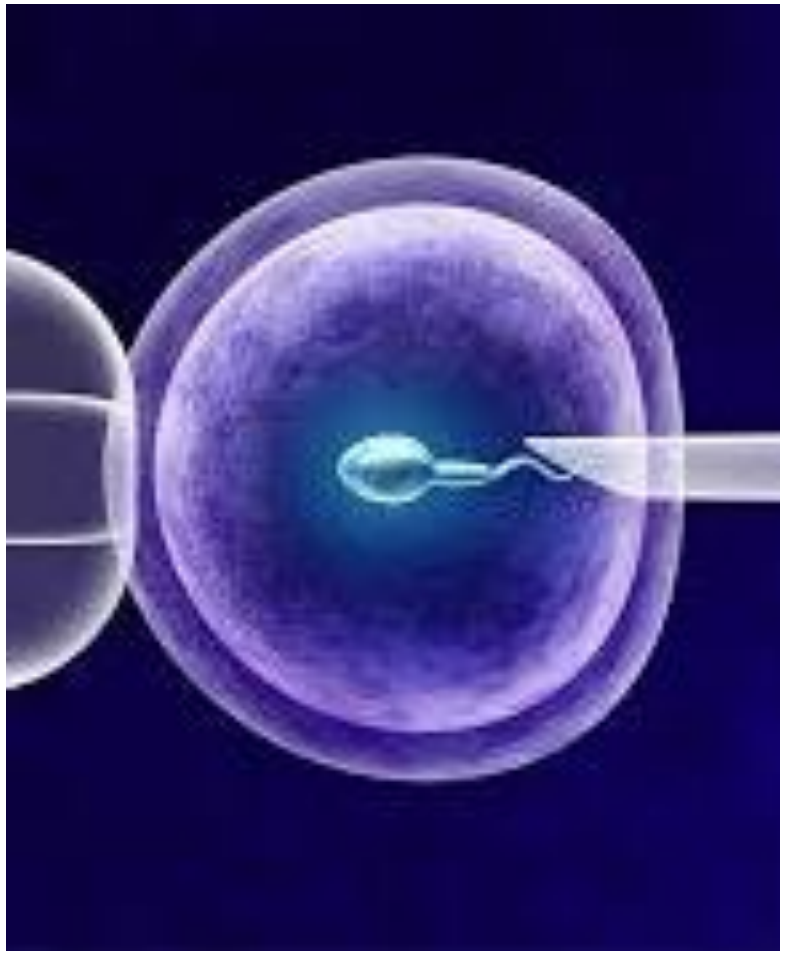


MIV

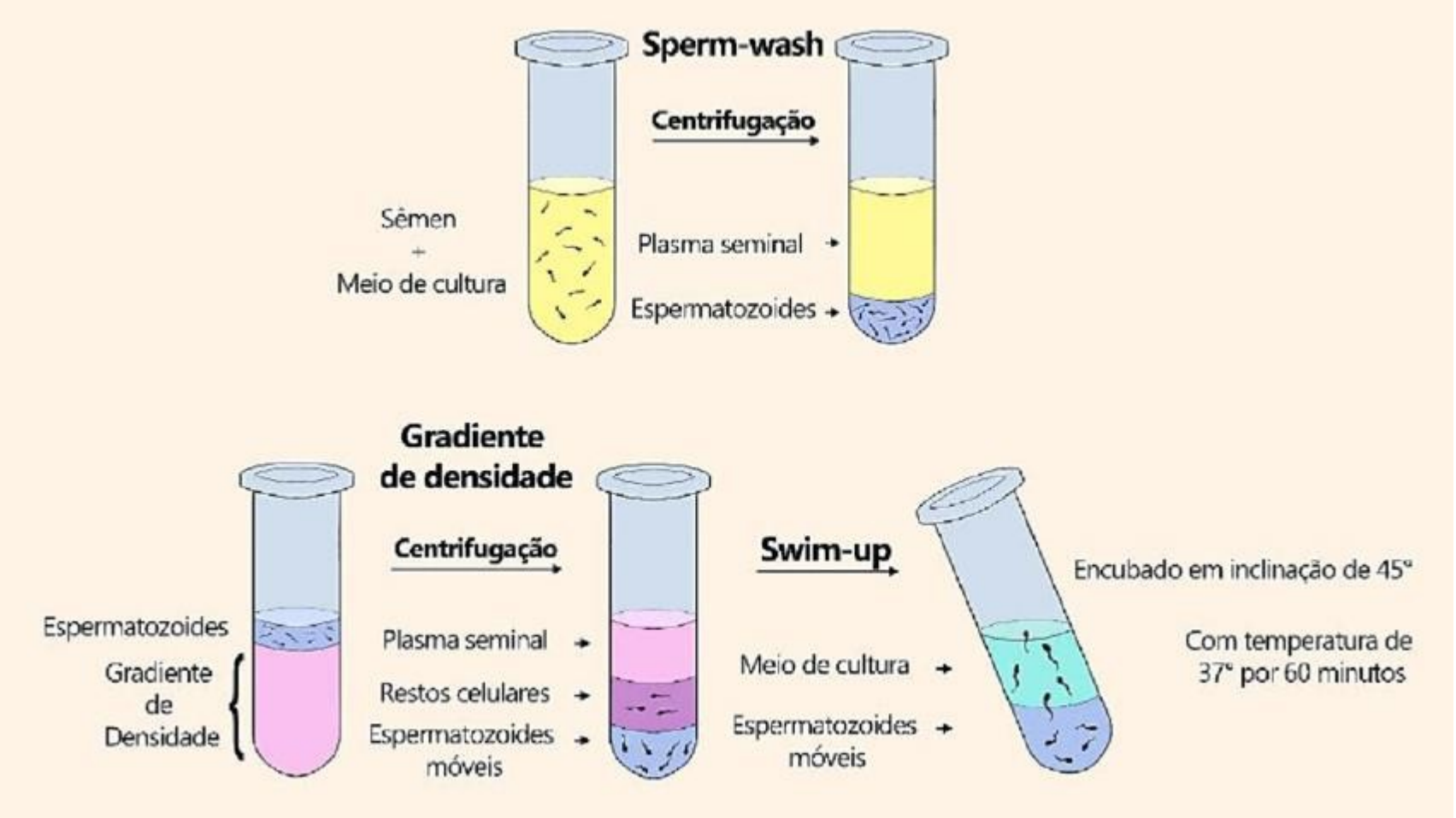
- Para ser considerado maduro, o oócito precisa estar apto a: completar a divisão meiótica, descondensar a cabeça do espermatozoide e suportar o desenvolvimento embrionário subsequente

ETAPAS

- ***Fertilização in vitro***
- Para a FIV espermatozóides e oócitos maturos são co-incubados em
  um meio específico, por um período de 18 a 22 horas.
- Temperatura, umidade e atmosfera controladas.



PREPARAÇÃO ESPERMATOZOIDES



SEXAGEM DO ESPERMATOZOIDE

- Biotécnica que pode ser realizada antes da FIV por **citometria de fluxo**.
- Basea-se na quantidade de DNA de cada espermatozóide. Os espermatozoides Y apresentam menor quantidade de DNA, logo se coram menos pelos corantes fluorescentes e, dessa forma, podem ser separados dos demais.

ETAPAS

- ***Cultivo de embriões***
- Dar condições adequadas para as primeiras clivagens, ativação do DNA embrionário e desenvolvimento até o estágio de blastocisto.
- Após a fecundação in vitro, os embriões são transferidos para o cultivo embrionário onde
  permanecem por um período de sete dias.

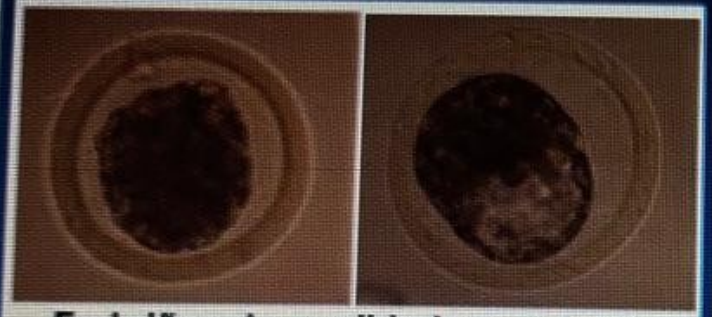
CIV

- A preparação do cultivo in vitro é decisiva para o êxito da PIV.
- A composição dos meios usados artificialmente deve simular o ambiente e os fluidos do útero e da tuba uterina
  durante o início da gestação.
- Nutrientes, pH, hormônios e oxigênio são fatores importantes para a preparação do CIV e devem estar presentes
  nas mesmas quantidades ou aproximadas ao ambiente uterino

TE OU CRIOPRESERVAÇÃO

- Após o cultivo, o embrião produzido será congelado ou transferido para receptora.
- Avaliação embrionária: viabilidade, cor, formato, integridade da zona pelúcida e aspecto morfológico,
  também se enquadram como fatores que classificam a qualidade dos embriões.

Classificação de embriões bovinos produzidos *in vivo* de acordo com a qualidade morfológica

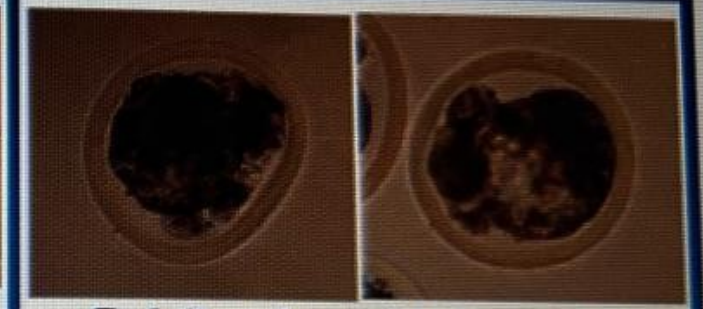


Embriões de qualidade excelente
Código IETS: 1

Comentários: Embriões sem defeitos morfológicos ou extrusões celulares, e estádio de desenvolvimento compatível com período pós-ovulação. Máximo potencial de desenvolvimento a fresco ou criopreservado.

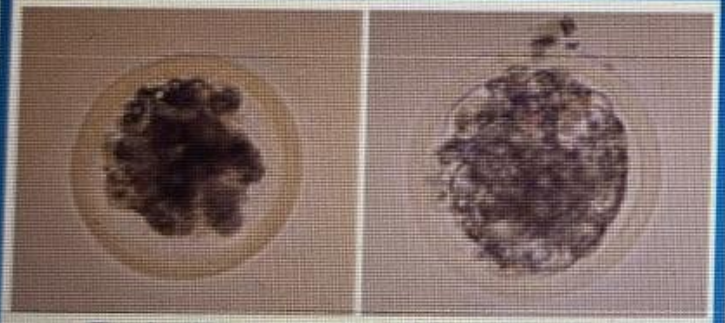
Embriões de qualidade boa
Código IETS: 1

Comentários: Embriões com uma ou poucas células de extrusão ou discretas alterações de coloração. Potencial de desenvolvimento semelhante ao embrião grau I, podendo também ser criopreservado.



Embriões de qualidade regular
Código IETS: 2

Comentários: Embriões com maior número de alterações morfológicas ou extrusões celulares, mas com pelo menos 50% da massa celular íntegra e mostrando sinais de desenvolvimento.

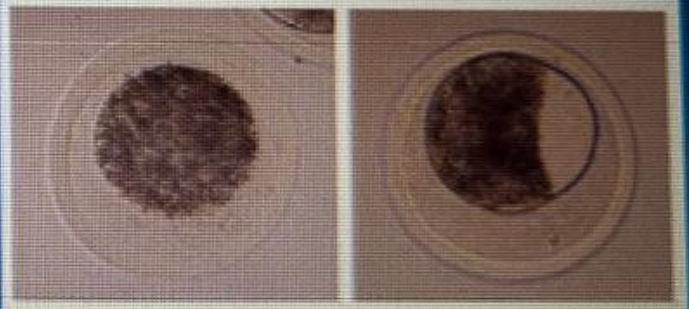


Embriões de qualidade pobre
Código IETS: 3

Comentários: Extrusões ou fragmentação comprometendo mais que 50% da massa celular, e dificultando a classificação das células viáveis. Potencial de desenvolvimento significativamente reduzido.

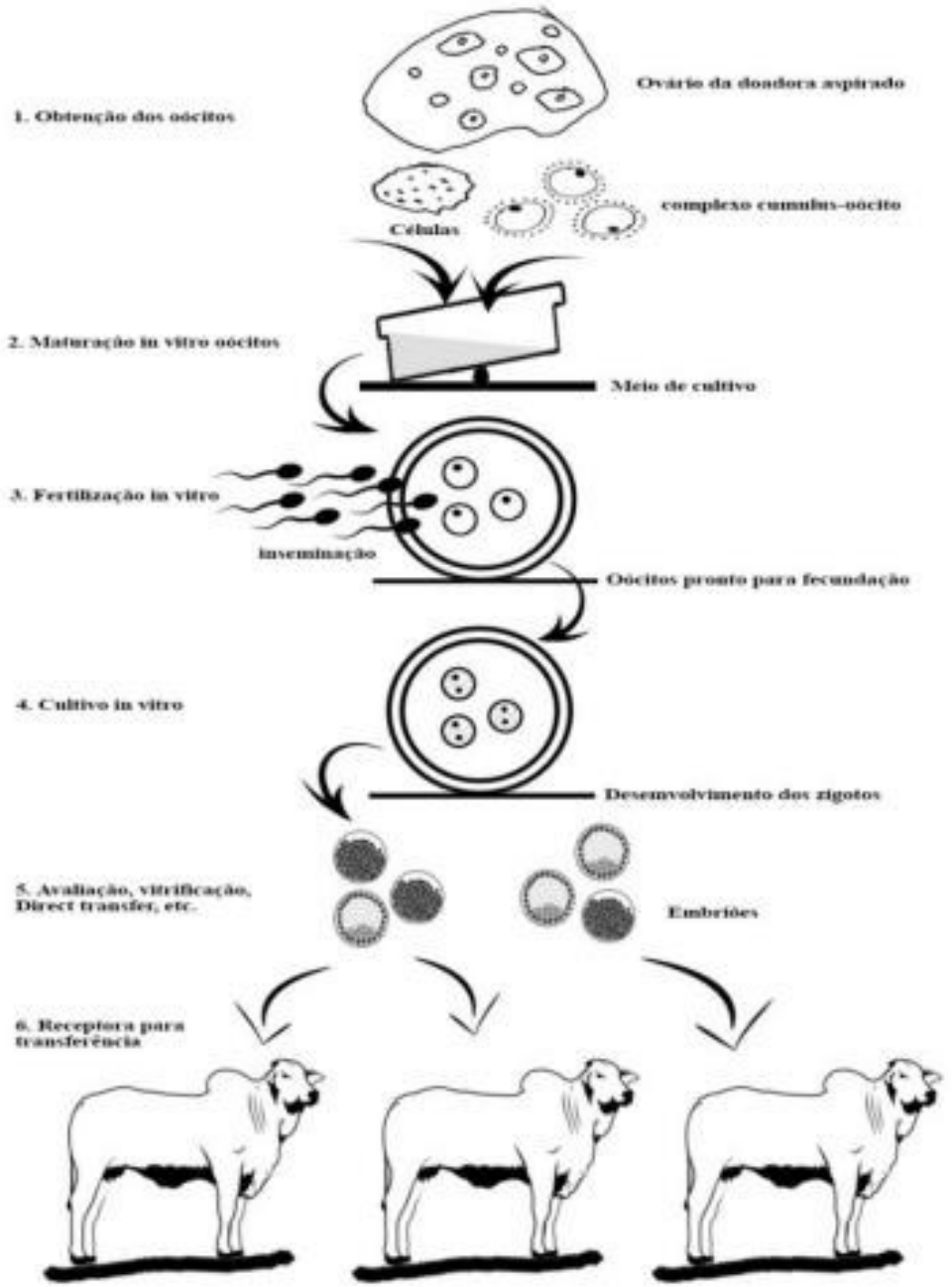
Embriões degenerados
Código IETS: 4

Comentários: Embriões com comprometimento definitivo da massa celular, com blastômeros de tamanhos variados apresentando sinais de degeneração celular, picnose, fragmentação e alterações de cor.



Oócitos não fecundados

Comentários: Oócito sem sinais de clivagem, apresentando graus variados de retração, pulverização ou sedimentação do citoplasma. No menor aumento podem ser confundidos com mórula compacta ou Bl.


1. Obtenção dos oócitos
Ovário da doadora aspirado
Células
complexo cumulus-oócito
2. Maturação in vitro oócitos
Meio de cultivo
3. Fertilização in vitro
inseminação
Oócitos pronto para fecundação
4. Cultivo in vitro
Desenvolvimento dos zigotos
5. Avaliação, vitrificação,
Direct transfer, etc.
Embriões
6. Receptora para
transferência

LIMITAÇÕES

- Biotécnica onerosa.
- Taxas zootécnicas ainda baixas.
- Animais muito jovens ou muito velhos apresentam redução na competência oocitária e
desenvolvimento embrionário